

• 研究论文 •

注射用重组艾塞那肽-人血清白蛋白融合蛋白 E2HSA 对小鼠胰岛 β 细胞功能的保护作用

李彩娜, 刘率男, 刘 泉, 环 奕, 孙素娟, 申竹芳*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 晶型药物研究北京市重点实验室, 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050)

摘要: 注射用艾塞那肽-人血清白蛋白融合蛋白 (injectable recombinant protein of exendin-4 and human serum albumin, E2HSA) 是我国自主研发的一种长效胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 受体激动剂, 目前处于临床研究阶段。本研究在细胞和整体动物水平研究 E2HSA 对胰岛 β 细胞的保护作用。在细胞水平, 采用小鼠胰岛素瘤细胞株 NIT-1 考察 E2HSA 对细胞活力和增殖的影响; 采用水溶性胆固醇诱导 NIT-1 细胞损伤, 考察 E2HSA 对细胞活力和凋亡的影响, 并研究其相关作用机制。在整体动物水平, 采用四氧嘧啶高血糖小鼠考察长期注射 E2HSA 对血糖、血清胰岛素和胰岛内胰岛素含量的影响。动物实验操作和福利均遵循中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物伦理与动物福利委员会的规定。结果显示, E2HSA 可明显增加 NIT-1 细胞的活力和掺入的溴脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU); 同时显著增加水溶性胆固醇诱导 NIT-1 细胞损伤后的细胞活力, 减少其凋亡发生率, 并增加胞内胰腺-十二指肠同源框 1 (pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 蛋白的表达。E2HSA 长期注射可明显降低四氧嘧啶小鼠的空腹血糖和非禁食血糖, 增加其血清和胰岛内的胰岛素含量。综上, E2HSA 可以促进 NIT-1 细胞增殖, 抑制水溶性胆固醇诱导的细胞损伤和凋亡, 同时增加四氧嘧啶高血糖小鼠血清和胰岛内的胰岛素水平, 提示 E2HSA 可改善小鼠胰岛 β 细胞功能。

关键词: E2HSA; 胰岛 β 细胞; 增殖; 凋亡; 四氧嘧啶高血糖小鼠

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1175-07

Protective effects of the injectable recombinant protein of exendin-4 and human serum albumin, E2HSA, on mouse islet β cell function

LI Cai-na, LIU Shuai-nan, LIU Quan, HUAN Yi, SUN Su-juan, SHEN Zhu-fang*

(Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The injectable recombinant protein of exendin-4 and human serum albumin (HSA), E2HSA, is a long-acting glucagon like-peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, which is in clinical research stage now. This study aimed to evaluate the protective effects of E2HSA on mouse islet β cell function *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the mouse insulinoma cells NIT-1 were used to assay the effects of E2HSA on cell viability and proliferation. Besides, the water soluble cholesterol was adopted to induce cell injury, and then the effects of E2HSA on cell viability and apoptosis, as well as the mechanism, were studied. *In vivo*, the alloxan-induced hyperglycemic mice were repeatedly administered with E2HSA by subcutaneous injection, and the blood glucose, serum insulin, and content of insulin

收稿日期: 2019-12-30; 修回日期: 2020-01-27.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2016-I2M-2-006).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-83172669, E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1062

in islets were measured. All animal experiments were carried out with approval of the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of the Institute of Materia Medica (Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College). The results showed that E2HSA significantly increased the viability of NIT-1 cells and the amount of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporated in cells. Besides, the water soluble cholesterol significantly decreased the cell viability and induced apoptosis of NIT-1 cells, but E2HSA significantly reversed the injury of NIT-1 cells. Nevertheless, E2HSA significantly increased the expression of pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) and protein kinase B (PKB) of NIT-1 cells after injured by water soluble cholesterol. Furthermore, repeated injections of E2HSA significantly reduced the fasting and non-fasting blood glucose, increased the serum insulin level and raised the insulin content in β cells of alloxan-induced hyperglycemic mice. In conclusion, E2HSA could promote proliferation of NIT-1 cells, inhibit the water soluble cholesterol induced injury and apoptosis, and increase the insulin content in serum and islets of alloxan-induced hyperglycemic mice, suggesting the protective effects on pancreatic islet β cell function.

Key words: E2HSA; islet β cell; proliferation; apoptosis; alloxan-induced hyperglycemic mice

胰高血糖素样肽-1 (glucagon like-peptide-1, GLP-1) 是肠道L细胞分泌的一种降糖激素, 通过结合并激活其受体发挥抗糖尿病作用, 包括葡萄糖依赖性促进胰岛素的生物合成和分泌、促进胰岛 β 细胞增殖和化生、抑制 β 细胞凋亡等^[1]。GLP-1的发现开启了糖尿病治疗的新时代。注射用重组艾塞那肽-人血清白蛋白融合蛋白(酵母菌), 简称E2HSA (injectable recombinant protein of exendin-4 and human serum albumin), 是我国自主研发的一种超长效GLP-1受体激动剂, 用于治疗2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM), 目前处于临床研究阶段。前期研究表明, E2HSA可以结合并激活GLP-1受体, 并且多种T2DM动物模型中的研究证明其具有显著的抗糖尿病作用^[2-4]。

1型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是一种由胰岛 β 细胞严重破坏导致胰岛素绝对缺乏而诱发高血糖的疾病, 目前无法治愈, 需要终身使用胰岛素治疗。由胰岛 β 细胞损伤引起的胰岛素缺失是T1DM的发病基础, 而大量研究表明GLP-1可以促进 β 细胞增殖和化生, 抑制其发生凋亡^[4]。因此, GLP-1类药物可能有益于T1DM患者的血糖控制。本文将从细胞和整体动物水平研究E2HSA对小鼠胰岛 β 细胞的保护作用, 并初步探索其作用机制, 从而为拓展其临床应用提供实验依据。

材料与amp;方法

药物、试剂及实验仪器 注射用重组艾塞那肽-人血清白蛋白融合蛋白(酵母菌, E2HSA, 批号20120706, 浙江华阳药业有限公司), 4℃保存; 艾塞那肽注射液(百泌达, exendin-4, 批号A935047, 美国Baxter Pharmaceutical Solutions LLC公司), 4℃保存; DMEM/F12培养基(美国Hyclone公司); CCK-8 (cell

counting kit-8) 测定试剂盒(上海同仁化学); Bromodeoxyuridine (BrdU) 和 BrdU 抗体(武汉博士德生物技术有限公司); 四氧嘧啶、水溶性胆固醇和碘化丙啶(propidium iodide, PI) (Sigma公司); RIPA (radio-immunoprecipitation assay) 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、复合磷酸酶抑制剂、BCA (bicinchoninic acid) 蛋白定量试剂盒、5×上样缓冲液(北京普利莱基因生物技术有限公司); 兔PKB (protein kinase B) 抗体(美国SAB公司); 兔PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1) 抗体(美国Santa Cruz公司); ECL (electro-chemi-luminescence) 发光液(北京康为世纪科技有限公司); 小鼠 β -actin抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗、FITC (fluorescein isothiocyanate) 标记的山羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); 小鼠胰岛素ELISA (enzyme-linked immune sorbent assay) 试剂盒(美国ALPCO公司); U-Quant酶标仪(美国BIO-TEK公司); 流式细胞分析仪(美国Beckman Coulter公司); 倒置荧光显微镜(德国Leica公司); Western blot电泳仪和转膜仪(美国Biotek公司)。

动物与细胞株 正常ICR小鼠, 雄性, 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号为SCXK(京)2002-0003, 饲养于中国医学科学院药物研究所SPF级(屏障设施)动物房。小鼠胰岛素瘤细胞株NIT-1购自美国ATCC细胞库。动物实验操作和福利均遵循中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所实验动物伦理与动物福利委员会的规定。

E2HSA对NIT-1细胞活力的影响 将处于对数生长期的NIT-1细胞消化并接种于96孔板(1.5×10⁴个/孔), 同时加入E2HSA, 使其终浓度分别为0.1、1、10、100和1 000 nmol·L⁻¹。设置空白对照孔和阳性对照孔(exendin-4, 100 nmol·L⁻¹), $n = 6$ 。37℃、5.0% CO₂条件

下培养24 h, 加入CCK-8反应液。继续培养4 h, 测定450 nm处吸收度, 以650 nm处吸收度进行校正。

E2HSA对NIT-1细胞增殖的影响 将NIT-1细胞接种至24孔板(8×10^4 个/孔), 同时加入BrdU($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。37 °C、5.0% CO_2 条件下培养0.5 h, 加入E2HSA($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 设置空白对照孔和阳性对照孔(exendin-4, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。继续培养36 h, 接着弃去培养基, 并加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗3次(5 min/次), 加入4%多聚甲醛, 室温固定50 min。按照以下步骤进行免疫荧光标记: 加入0.5% TritonX-100/PBS, 室温孵育10 min, 清洗后加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 室温作用40 min, 清洗后加入3%正常山羊血清工作液, 37 °C孵育30 min, 加入BrdU单克隆抗体(1:50), 37 °C孵育30 min, 加入含0.1% Tween-20的PBS缓冲液, 清洗后加入FITC标记的山羊抗小鼠二抗(1:50), 37 °C避光孵育30 min, 加入去离子水清洗2次(5 min/次), 封片, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

E2HSA对水溶性胆固醇诱导NIT-1细胞损伤后细胞活力的影响 将NIT-1细胞接种至96孔板(1.5×10^4 个/孔), 37 °C、5.0% CO_2 条件下培养24 h, 然后加入水溶性胆固醇($0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 h后再加入E2HSA, 使其终浓度分别为0.1、1、10、100和1 000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 设置未加入水溶性胆固醇的正常对照孔、加入水溶性胆固醇的模型对照孔和阳性对照孔(exendin-4, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $n = 6$ 。继续培养12 h, 加入CCK-8反应液, 培养4 h后测定450 nm处吸收度, 以650 nm处吸收度进行校正。

E2HSA对水溶性胆固醇诱导NIT-1细胞损伤后细胞凋亡的影响 将NIT-1细胞接种至6孔板(3.6×10^5 个/孔), 37 °C、5.0% CO_2 条件下培养24 h, 然后加入水溶性胆固醇($0.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 h后再加入E2HSA($500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 设置正常对照孔、模型对照组孔和阳性对照孔(exendin-4, $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $n = 3$ 。继续培养15 h, 收集细胞并加入PBS缓冲液清洗, 接着缓慢滴加冷无水乙醇, 混匀, 4 °C固定细胞至少2 h。1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心8 min, 弃去固定液, 清洗细胞2次, 加入PI染液, 并于37 °C水浴放置30 min, 灭活RNA。用300目滤网过滤后进行流式细胞仪检测。

蛋白表达检测 将NIT-1细胞接种至新培养瓶(1.5×10^6 个/孔), 37 °C、5.0% CO_2 条件下培养24 h, 然后更换含有 $0.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶性胆固醇的培养基(设置正常培养基对照孔), 1 h后再加入E2HSA($500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 设置模型对照孔和阳性对照孔(exendin-4, $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $n = 4 \sim 5$ 。继续培养15 h, 收集细胞, 加入RIPA蛋白裂解液(预先加入蛋白酶抑制剂和复合磷酸酶抑制剂),

提取胞内总蛋白。采用BCA法进行蛋白定量后, 加入5 \times 上样缓冲液, 于沸水浴中煮沸10 min, 使蛋白变性。采用Western blot方法考察PDX-1和PKB的蛋白表达。

四氧嘧啶小鼠模型的形成及药物处理 正常ICR小鼠尾静脉注射四氧嘧啶($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 6天后首先禁食2.5 h(自由饮水), 接着尾尖采血并记录体重, 测定空腹血糖。然后以体重和空腹血糖将小鼠分为5组: 模型对照组、E2HSA(2.5、5和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组和exendin-4($2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, $n = 10$ 。E2HSA各剂量组每天皮下注射给药1次, exendin-4组每天皮下注射给药2次, 模型对照组每天皮下注射给予相同体积的生理盐水。

E2HSA长期给药对四氧嘧啶小鼠血糖的影响 分别于给药第3、10、16、23、30和38天, 尾尖采血, 测定各组小鼠非禁食血糖。然后禁食2 h(自由饮水), 接着皮下注射给药或生理盐水, 0.5 h后再次尾尖采血, 测定空腹血糖。

E2HSA长期给药对四氧嘧啶小鼠血清和胰岛内胰岛素含量的影响 给药41天后处死小鼠, 分离血清, 测定血清胰岛素水平; 分离胰腺组织, 固定于Bouin氏液, 经石蜡包埋和切片后, 按照以下步骤进行免疫组织化学染色: 组织切片于60 °C恒温箱中烘烤2 h, 二甲苯中脱蜡, 100%、95%、80%和70%乙醇、蒸馏水和PBS缓冲液中复水, 滴加3%过氧化氢溶液, 避光孵育5 min, PBS溶液洗片, 置于Tris-EDTA抗原修复液(pH 9.0)中, 采用热煮沸法进行抗原修复, 冷却, 洗片后滴加羊血清, 室温孵育25 min, 滴加小鼠胰岛素抗体(1:50), 4 °C孵育过夜, 取出切片平衡至室温, 洗片后滴加生物素标记的山羊抗小鼠二抗, 37 °C孵育25 min, 洗片后滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素, 37 °C孵育25 min, 洗片后滴加显色剂(diaminobezidin, DAB), 室温避光孵育2 min, 蒸馏水洗片, 滴加Harris苏木素, 染色10 s, 蒸馏水洗片后于盐酸乙醇中分化15 s, 反蓝10 min, 80%、95%、95%、100%和100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 60 °C烘烤10 min并冷却, 于倒置显微镜下观察并拍照。

数据处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用IPP6.0软件分析胰腺内胰岛素免疫组化染色阳性区域的面积, 采用凝胶分析软件分析Western blot蛋白条带的灰度值。

结果

1 E2HSA对NIT-1细胞增殖的影响

与空白对照组(negative control, Nor)相比, E2HSA在 $0.1 \sim 1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内与NIT-1细胞共同孵育均能够明显增加细胞活力, 并具有一定的量效关

系; exendin-4 在 100 nmol·L⁻¹ 下也可显著增加 NIT-1 细胞的活力 (表 1)。与 Nor 组相比, E2HSA 和 exendin-4 在 100 nmol·L⁻¹ 均能够增加 NIT-1 细胞内绿色荧光蛋白的表达, 表现为绿色荧光的亮度和聚集程度增加 (图 1)。结果表明 E2HSA 具有促进胰岛 β 细胞增殖的作用。

Table 1 Effect of the injectable recombinant protein of exendin-4 and human serum albumin (E2HSA) on the viability of NIT-1 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001$ vs negative control (Nor)

Group	Concentration/nmol·L ⁻¹	A _{450/650}
Nor	-	0.860 ± 0.057
E2HSA	0.1	0.892 ± 0.034*
	1	0.890 ± 0.058*
	10	0.905 ± 0.052**
	100	0.927 ± 0.044***
	1 000	0.916 ± 0.043**
Exendin-4	100	0.904 ± 0.070**

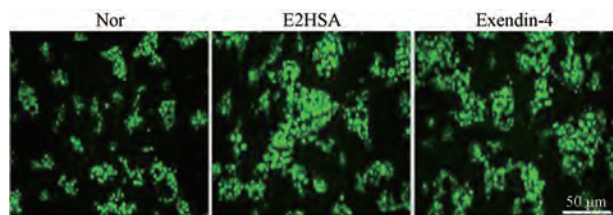


Figure 1 Effects of E2HSA on the amount of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporated in NIT-1 cells. BrdU was incorporated in the cells and determined with BrdU primary antibody and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled second antibody. The photos were taken with 100 × magnification and the cells of the negative control (Nor) group were treated with equal volume of phosphate buffered saline (PBS)

2 E2HSA 对水溶性胆固醇诱导 NIT-1 细胞损伤的影响

与 Nor 组相比, 模型对照组 (control, Con) 细胞的活力明显降低 ($P < 0.001$), 表明水溶性胆固醇明显诱导 NIT-1 细胞发生损伤。与 Con 组相比, E2HSA 在 1~1 000 nmol·L⁻¹ 浓度可明显增加 NIT-1 细胞的活力 ($P < 0.05$); exendin-4 在 100 nmol·L⁻¹ 下也可显著增加 NIT-1 细胞的活力 (表 2)。此外, 与 Nor 组相比, Con 组细胞显著发生凋亡, 出现明显的亚二倍体凋亡峰, 凋亡发生率为 23.4% ($P < 0.001$)。与 Con 组相比, E2HSA 和 exendin-4 在 500 nmol·L⁻¹ 浓度下可在一定程度上抑制亚二倍体峰的产生, 减少细胞的凋亡发生率, 分别为 16.5% 和 17.2% ($P < 0.01$, 图 2)。结果表明 E2HSA 具有抑制胰岛 β 细胞凋亡的作用。

3 E2HSA 对水溶性胆固醇诱导 NIT-1 细胞损伤后 PKB 和 PDX-1 表达的影响

与 Nor 组相比, Con 组细胞内 PKB 和 PDX-1 蛋白的表达均明显降低 (PKB, $P < 0.001$; PDX-1, $P < 0.01$),

Table 2 Effect of E2HSA on the viability of NIT-1 cells injured by water soluble cholesterol. $n = 6, \bar{x} \pm s. ***P < 0.001$ vs Nor; # $P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001$ vs Con. Nor: Cells cultured in normal conditions; Con: Cells cultured in the presence of 0.125 mmol·L⁻¹ cholesterol

Group	Concentration/nmol·L ⁻¹	A _{450/650}
Nor	-	1.235 ± 0.022
Con	-	0.806 ± 0.042***
E2HSA	0.1	0.843 ± 0.040
	1	0.865 ± 0.039#
	10	0.907 ± 0.056##
	100	0.881 ± 0.023#
	1 000	0.968 ± 0.037###
Exendin-4	100	0.864 ± 0.030#

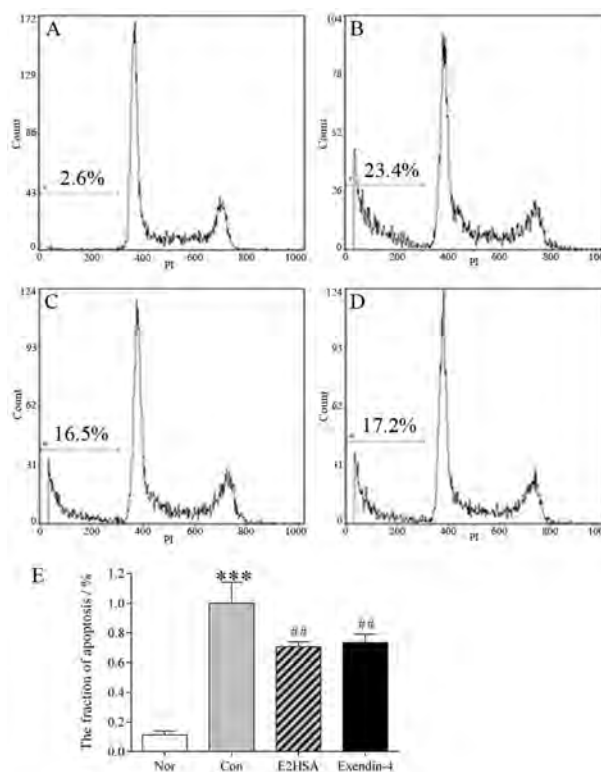


Figure 2 Effects of E2HSA on the apoptosis of NIT-1 cells induced by water soluble cholesterol (CHO). A: Cells cultured in normal conditions (Nor); B: Cells cultured in the presence of 0.125 mmol·L⁻¹ water soluble CHO (Con); C: Cells cultured in the presence of 0.125 mmol·L⁻¹ water soluble CHO and 500 nmol·L⁻¹ E2HSA (E2HSA); D: Cells cultured in the presence of 0.125 mmol·L⁻¹ water soluble CHO and 500 nmol·L⁻¹ exendin-4 (Exendin-4); E: Analysis of the apoptosis fraction and the value of the Con group was defined as 100%. $n = 3, \bar{x} \pm s. ***P < 0.001$ vs Nor, ## $P < 0.01$ vs Con. PI: Propidium iodide

表明水溶性胆固醇诱导 NIT-1 细胞损伤与降低胞内 PKB 和 PDX-1 蛋白表达有关。与 Con 组相比, E2HSA 在 500 nmol·L⁻¹ 浓度下可明显增加细胞内 PKB 和 PDX-1 蛋白的表达 (PKB, $P < 0.01$; PDX-1, $P < 0.05$); ex-

endin-4 在 $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下也可明显增加 2 种蛋白的表达 (PKB, $P<0.001$; PDX-1, $P<0.01$) (图 3)。结果表明 E2HSA 抑制胰岛 β 细胞凋亡的作用与增加胞内 PKB 和 PDX-1 蛋白的表达有关。

4 E2HSA 长期给药对四氧嘧啶小鼠血糖的影响

与 Con 组相比, 每天皮下注射 E2HSA (2.5 、 5 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可显著降低四氧嘧啶高血糖小鼠的非禁食血糖和空腹血糖, 但随着给药时间的延长, 该作用有所减弱, 表明 E2HSA 长期给药可控制 T1DM 小鼠的血糖波动, 其作用减弱可能与抗体生成有关^[3]。每天皮下注射 exendin-4 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 也可降低四氧嘧啶高血糖小鼠的空腹血糖, 但作用强度随着给药时间延长亦有所减弱; exendin-4 对四氧嘧啶小鼠的非禁食血糖无明显影响 (图 4)。

5 E2HSA 长期给药对四氧嘧啶小鼠血清和胰岛内胰岛素水平的影响

与 Con 组相比, 每天皮下注射 E2HSA (2.5 、 5 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可增加四氧嘧啶高血糖小鼠的血清胰岛素水平, 并具有良好的量效关系, 但组内个体差异较大; 每天皮下注射 exendin-4 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 也可增加小鼠血清胰岛素水平 (图 5A)。此外, 与 Con 组相比, E2HSA (5 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 还可不同程度地增加四氧嘧啶高血糖

小鼠胰岛内的胰岛素含量, 其中 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的作用具有统计学意义, 但是组内个体差异较大 (图 5B~E)。该结果表明 E2HSA 可能保护 T1DM 小鼠胰岛 β 细胞, 增加胰岛素的生物合成和分泌。

讨论

糖尿病是一种复杂的代谢性疾病, 发病率极高, 且呈现年轻化趋势。因此, 深入研究其发病机制和研发新型的抗糖尿病药物迫在眉睫^[5]。上世纪初, Moore 等^[6]发现十二指肠存在能够刺激胰腺的化学物质, 随后 La Barre 等^[7]将这种物质命名为肠降糖素“incretin”。随着研究的深入, 2 种肠降糖素, 即葡萄糖依赖性促胰岛素分泌多肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 和 GLP-1 被先后分离鉴定。有研究发现, T2DM 患者体内 GIP 水平正常, 而 GLP-1 水平有所降低, 且给予外源性 GLP-1 能够明显诱导胰岛素分泌并调节糖代谢。不仅如此, 健康人进食后约 $2/3$ 的胰岛素分泌都与肠降糖素有关, 而 T2DM 患者中肠降糖素介导的胰岛素分泌明显减少, 提示 GLP-1 可能作为糖尿病治疗的重要靶点。尽管如此, GLP-1 进入血液循环后很快被二肽基肽酶 IV 和中性内肽酶 24.11 等降解, 半衰期仅有 $1\sim 2 \text{ min}$, 无法直接应用于临床。因

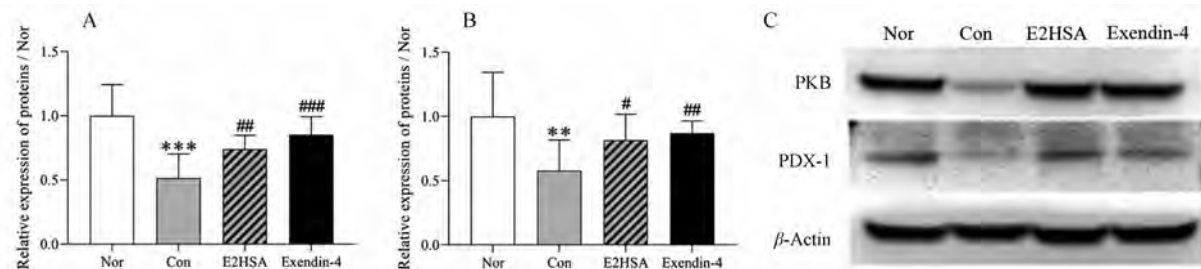


Figure 3 Effect of E2HSA on the expression of protein kinase B (PKB) and pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) in NIT-1 cells injured by water soluble cholesterol. A: Relative expression of PKB; B: Relative expression of PDX-1; C: Representative blots of PKB, PDX-1, and β -actin. Nor: Cells cultured in normal conditions; Con: Cells cultured in the presence of $0.125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ cholesterol; All data were normalized to β -actin and the value of the Nor group was defined as 1. $n = 4\sim 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Nor; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs Con

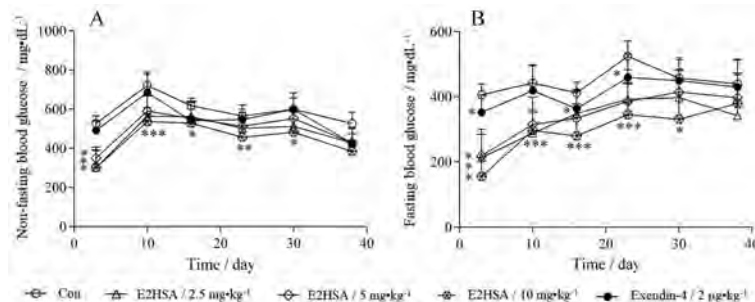


Figure 4 Effects of repeated administration of E2HSA on the variation of blood glucose in alloxan-induced hyperglycemic mice. A: Non-fasting blood glucose; B: Fasting blood glucose. Con: The hyperglycemic mice treated with vehicle. $n = 8\sim 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Con

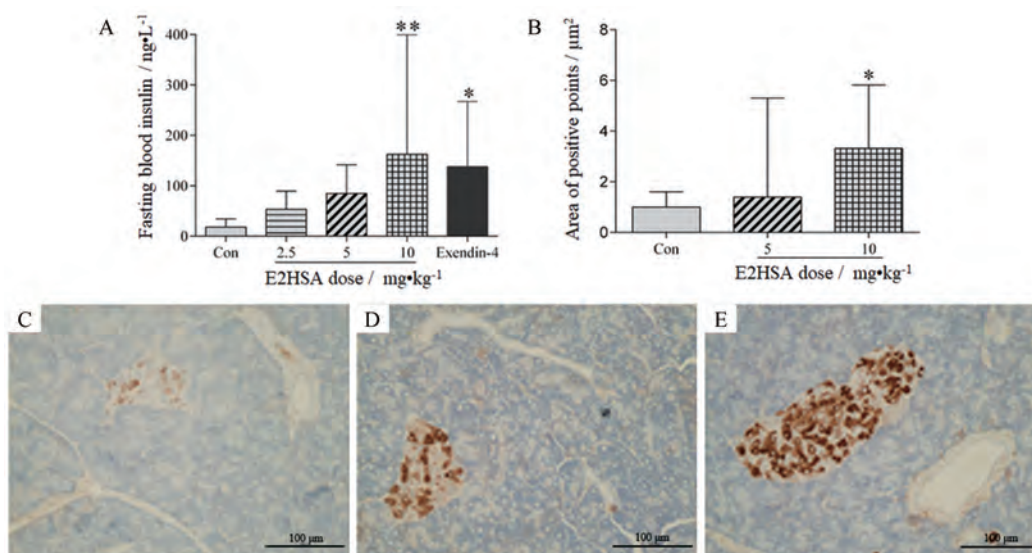


Figure 5 Effects of repeated administration of E2HSA on fasting blood insulin and insulin content in the islets of alloxan-induced hyperglycemic mice. A: Fasting blood insulin; B: Area of insulin-positive points in the islets. Con: The hyperglycemic mice treated with vehicle. C: Immunohistochemical staining of insulin in the control mice; D: Immunohistochemical staining of insulin in mice treated with E2HSA at 5 mg·kg⁻¹; E: Immunohistochemical staining of insulin in mice treated with E2HSA at 10 mg·kg⁻¹. Magnification, 200×. *n* = 8–10 for A and *n* = 8 for B–E. $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs Con

此,对GLP-1进行结构修饰、合成可耐受酶解的GLP-1类似物^[8]以及建立GLP-1受体激动剂筛选模型以筛选活性化合物^[9],成为研发抗糖尿病药物的重要途径。

目前国外已先后有艾塞那肽、利拉鲁肽、阿必鲁肽、度拉鲁肽和利西拉来等多种GLP-1类药物被批准上市,并且度拉鲁肽和阿必鲁肽可每周皮下注射1次,而国内在GLP-1类药物研发方面尚属空白。E2HSA是我国自主研发的一类长效GLP-1类药物,由2分子艾塞那肽和1分子人血清白蛋白融合表达获得,目前处于临床研究阶段,每周皮下注射1次,用于治疗T2DM。临床前研究发现,E2HSA可显著改善2型糖尿病小鼠的糖代谢,同时增强β细胞对葡萄糖刺激的反应性,并抑制β细胞凋亡^[2]。这不仅表明E2HSA可通过维持β细胞数量而阻止T2DM的恶化,更使人们推测它可能有助于T1DM患者的血糖控制。

T1DM是一种以自身免疫损伤介导胰岛β细胞损伤且造成胰岛素绝对缺乏为主要特征的糖尿病,患者主要依赖外源性胰岛素维持血糖稳态。尽管许多整体动物水平的研究表明,GLP-1可促进β细胞增殖和化生,抑制其发生凋亡,但GLP-1类药物尚未被批准用于治疗T1DM^[10]。Janzen等^[11]对9项有关GLP-1受体激动剂治疗T1DM的临床试验进行综合分析,提出GLP-1受体激动剂可被考虑用于超重或肥胖、且使用胰岛素治疗效果不佳的T1DM患者,但需注意观察药物的耐受性。因此,研究E2HSA对胰岛β细胞的保护作用

可评价其对T1DM小鼠糖代谢的影响,将为其用于治疗T1DM提供实验依据。

胰岛内β细胞数量主要依靠细胞的增殖、新生与凋亡、坏死来维持,而各种影响细胞增殖与凋亡的因素均会引起β细胞功能障碍。PDX-1不仅是调节胰岛素基因表达和胰岛素分泌的重要转录因子,还参与维持胰岛β细胞数量^[12]。Pdx-1基因常染色体显性突变可引起MODY4 (maturity-onset diabetes of the young 4)^[13]。此外,有研究发现,胰岛素可促进PDX-1定位于细胞核,并通过调节Pdx-1基因表达而抑制胰岛发生凋亡,提示PDX-1具有抗凋亡作用^[14]。Li等^[15]发现PDX-1是GLP-1受体信号通路中重要的转录因子,不仅参与GLP-1受体激动剂调节α细胞分泌胰高血糖素,还参与其调节β细胞分化、生长和存活。此外,磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B (phosphoinositide-3-kinase-PKB, PI3K-PKB) 信号通路也参与调节细胞生长、增殖、分化和凋亡等过程,研究表明激活该通路可促进β细胞增殖,抑制其发生凋亡^[16]。

虽然目前尚未明确引起T1DM患者胰岛β细胞数量减少的原因是坏死、凋亡、还是二者兼有,但是越来越多的研究表明,凋亡在β细胞自身免疫损伤中具有重要作用,而多种因素,如高糖、高脂、炎症等引起的β细胞活性氧元件生成增多是介导β细胞凋亡的一大“凶手”^[17]。水溶性胆固醇可诱导细胞膜上的自由基成为氧自由基,并使其浓度增加,同时又抑制或损伤细胞

本身的抗氧化酶类防御系统,降低其清除自由基的能力,最终导致细胞内脂质过氧化产物堆积增加而引起细胞损伤。本研究首先在体外水平分别从增殖和凋亡2个方面评价E2HSA对 β 细胞的保护作用,并初步探索其作用机制,结果显示E2HSA可促进小鼠胰岛素瘤细胞株NIT-1增殖,抑制氧化损伤引起的细胞凋亡,且该作用与调节PDX-1和PKB表达有关,表明E2HSA具有一定的胰岛 β 细胞保护作用。

四氧嘧啶高血糖小鼠是一种常用的T1DM动物模型,四氧嘧啶及其还原产物可以在体内形成氧化还原循环,产生超氧自由基,进而快速破坏胰岛 β 细胞,使胰岛素的合成减少,造成胰岛素绝对缺乏,最终引起实验动物发生类似人类T1DM的高血糖^[18]。E2HSA长期给药不仅显著降低四氧嘧啶小鼠血糖,还明显增加其胰岛内的胰岛素含量及血清胰岛素水平,表明E2HSA能够阻止T1DM小鼠胰岛 β 细胞数量的减少,保护其功能。

综上所述,在体外水平,E2HSA可促进小鼠胰岛素瘤细胞株NIT-1增殖,抑制氧化损伤诱导的细胞凋亡;在整体动物水平,E2HSA可降低T1DM小鼠的血糖,并增加其胰岛内和血清中胰岛素水平,初步表明E2HSA能够保护胰岛 β 细胞功能,为其在T1DM患者中的应用提供了实验依据。

References

- [1] Lee YS, Jun HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells [J]. *Metabolism*, 2014, 63: 9-19.
- [2] Hou S, Li C, Huan Y, et al. Effects of E2HSA, a long-acting glucagon like peptide-1 receptor agonist, on glycemic control and beta cell function in spontaneous diabetic *db/db* mice [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 817839.
- [3] Li C, Hou S, Liu S, et al. The albumin-exendin-4 recombinant protein E2HSA improves glycemic control and β -cell function in spontaneous diabetic KK^{AY} mice [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2017, 18: 48.
- [4] Li CN, Hou SC, Sun SJ, et al. Effects of E2HSA on the glycolipid metabolism and β -cell function in aged obese mice [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2017, 26: 44-50.
- [5] Li X, Ma HY, Li LP, et al. Progress in metabolomics research of diabetes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2019, 54: 828-837.
- [6] Moore B, Edie ES, Abram JH. On the treatment of the diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane [J]. *Biochem J*, 1906, 1: 28-38.
- [7] La Barre J, Still EU. Studies on the physiology of secretin. III. further studies on the effects of secretin on the blood sugar [J]. *Am J Physiol*, 1930, 91: 649-653.
- [8] Zheng YC. Preparation and the biological effect of fusion protein GLP-1-exendin-4/IgG4(Fc) fusion protein as long acting GLP-1 receptor agonist [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2015, 50: 1668-1672.
- [9] Huan Y, Shen ZF. A novel cell model targeted on GLP-1 receptor for application to anti-diabetic candidates screening [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2009, 44: 309-313.
- [10] Popovic DS, Stokic E, Popovic SL. GLP-1 receptor agonists and type 1 diabetes - where do we stand? [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21: 5292-5298.
- [11] Janzen KM, Steuber TD, Nisly SA. GLP-1 agonists in type 1 diabetes mellitus [J]. *Ann Pharmacother*, 2016, 50: 656-665.
- [12] Subramanian M, Thotakura B, Chandra Sekaran SP, et al. Naringin (4',5,7-trihydroxyflavone 7-rhamnoglucoside) attenuates β -cell dysfunction in diabetic rats through upregulation of PDX-1 [J]. *Cells Tissues Organs*, 2018, 206: 133-143.
- [13] Kushner JA, Ye J, Schubert M, et al. *Pdx1* restores β cell function in *Irs2* knockout mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 1193-1201.
- [14] Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, et al. Insulin protects islets from apoptosis *via* Pdx1 and specific changes in the human islet proteome [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 19575-19580.
- [15] Li Y, Cao X, Li LX, et al. Beta-cell Pdx-1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1 [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 482-491.
- [16] Wei D, Cui W, Wang HF. PI3K-Akt/PKB signal pathway and the function of pancreatic β -cell [J]. *Int J Endocrinol Metab* (国际内分泌代谢杂志), 2007, 2: 109-111.
- [17] Yuan T, Wang H. Type 1 diabetes mellitus and β -cell apoptosis [J]. *Section Endocrinol Foreign Med Sci* (国外医学·内分泌学分册), 2002, 22: 28-31.
- [18] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas [J]. *Physiol Res*, 2001, 50: 537-546.